

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

INTER LIBRARY LOAN REQUEST FORM

Borrower's Name SHARON FOLEY Org. or A.U. 1648 Phone 308-3983
 Serial Number 09/506011 Date of Request 4/27/01 Date Needed By 5/5/01

Please Attach Copy Of Abstract, Citation, Or Bibliography, If Available. Please Provide Complete Citation. Only One Request Per Form.

Author/Editor:
Journal/Book Title:
Article Title: <u>SEE ATTACHED,</u>
Volume (Issue):
Pages:
Year of Publication:
Publisher: <u>DI200462</u>
Remarks:

STIC Use Only

Accession Number: 343,558

LIBRARY ACTION	LC		NAL		NIH		NLM		NBS		PTO		OTHER	
	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd	1st	2nd
Local Attempts														
Date														
Initials														
Results														
Examiner Called														
Page Count														
Money Spent														

Provided By: Source and Date

Order d From: Source and Date

Remarks/Comments

1st & 2nd denotes time taken to a library

O/N - Under NLM means Overnight Service

FX - Means Faxed to us

CAPLUS
(4) Blum, H; Intervirology 1993, V35, P40 CAPLUS
(7) Carman, W; Lancet 1995, V345, P1406 CAPLUS
(8) Chiou, H; J Gen Virol 1997, V78, P2639
CAPLUS
(11) Hino, K; Dig Dis Sci 1995, V40, P566 CAPLUS
ALL CITATIONS AVAILABLE IN THE RE FORMAT

L16 ANSWER 9 OF 20 CAPLUS COPYRIGHT 2001 ACS
1998:497103 CAPLUS

ACCESSION NUMBER:

129:274369

DOCUMENT NUMBER:

Cationization of liposomal surface

TITLE:

charge enhances adjuvant

effect of liposomes for tumor vaccine

Nakanishi, Tsuyoshi; Kunisawa, Jun; Hayashi,

Akira; Tsutsumi, Yasuo; Hayakawa, Takao; Mayumi,

Tadanori

Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka

University, Suita, Osaka, 565-0871, Japan

Yakuzaigaku (1998), 58(2), 59-68

CODEN: YAKUA2; ISSN: 0372-7629

Nippon Yakuzai Gakkai

Journal

English

AUTHOR(S):

CORPORATE SOURCE:

SOURCE:

PUBLISHER:

DOCUMENT TYPE:

LANGUAGE:

AB In order to design an optimum liposome immunoadjuvant for tumor
vaccines, we investigated the relationship between liposome surface

Searcher : Shears 308-4994

NOV/27



薬 劑 学
YAKUZAIGAKU
58 (2) 59-68 (1998)

(June)

リポソームのカチオン化による腫瘍ワクチン用アジュバント効果増強

中西 剛^a, 國澤 純^a, 林 哲^a, 堤 康央^a, 早川 堯夫^b, 真弓 忠範^a

^a 大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野^a, 国立医薬品食品衛生研究所^b

Cationization of Liposomal Surface Charge Enhances Adjuvant Effect of Liposomes for Tumor Vaccine

TSUYOSHI NAKANISHI, JUN KUNISAWA, AKIRA HAYASHI, YASUO TSUTSUMI,
TAKAO HAYAKAWA and TADANORI MAYUMI

Graduate School of Pharmaceutical Science, Osaka University,

1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan, and

National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

(Received October 20, 1997)

PA

In order to design an optimum liposome immunoadjuvant for tumor vaccines, we investigated the relationship between liposomal surface charge and adjuvant action. Positively charged multilamellar vesicles (MLVs) were taken up efficiently by macrophages, while negatively charged and neutral MLVs were hardly picked up. Consistent with this, positively charged MLVs containing soluble ovalbumin (OVA) functioned as a more potent inducer of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses and antibody production than negatively charged and neutral MLVs containing the same concentrations of antigens. Furthermore, the *in vivo* anti-tumor effects of variously charged liposomal antigens were examined using a Meth A tumor model and a crude butanol extract derived from Meth A (Meth A-CBE) as the tumor-associated antigen. Mice vaccinated with positively charged MLVs containing Meth A-CBE showed significant inhibition of Meth A tumor growth compared to mice vaccinated with Meth A-CBE alone or mice vaccinated with neutral or negatively charged liposomal Meth A-CBE. The injection of carrageenan into mice led to a significant loss of anti-tumor vaccinal effect of positively charged liposomal Meth A-CBE, which may be due to the inhibition of uptake and antigen presentation of liposomal antigens by macrophages as a result of a lack of macrophages in the immune site. Our results indicate that the positive charge on the surface of liposomes represents an important factor for enhancing their immunoadjuvancy in the induction of

* To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations used in this paper: OVA, ovalbumin; CTL, cytotoxic T lymphocyte; Th, helper T lymphocyte; APC, antigen-presenting cell; PC, egg phosphatidylcholine; PA, L- α -dimyristoyl phosphatidic acid; Chol, cholesterol; SA, stearylamine; MLV, multilamellar vesicle; TAA, tumor-associated antigen; Meth A-CBE, crude butanol extract derived from Meth A.

RETURN this loan to:
CAS, POB 3012, Columbus, OH 43210 USA

YAKUZAIGAKU

YAKUZAIGAKU 58

2

1998

antigen-specific immune responses and vaccinal effects against tumors.

Keywords—positively charged liposome; macrophage; cytotoxic T lymphocyte; tumor vaccine

近年の目覚ましい制癌剤の開発にもかかわらず、癌化学療法はあまりの副作用のために未だ多くの問題を残しているのが現状であり、臨床応用が著しく制限されてしまっている。そのため次世代の治療法として、生体が元来有する生体防御機構を利用し、生体自身に腫瘍細胞を排除させようとする、腫瘍免疫療法が再認識されるようになってきている。中でも近年の分子生物学の発展により、様々な腫瘍細胞の腫瘍関連抗原 (TAA) が同定される¹⁻⁷⁾とともに、大量生産が可能となった昨今、TAA による腫瘍ワクチン療法の早期開発が待望されている。しかし、単に TAA のみを投与してもほとんど抗腫瘍効果が得られておらず、適切なアジュバントの開発が急務となってきている。

一方、効果的な腫瘍免疫の誘導には、腫瘍細胞を直接傷害できる MHC class I 拘束性の CD 8⁺ cytotoxic T lymphocyte (CTL) のみならず、MHC class II 拘束性の CD 4⁺ helper T lymphocyte (Th) の誘導が必要不可欠であることが明らかになりつつある。Hamaoka らのグループ⁸⁻¹⁰⁾や Kern ら¹¹⁾は MHC class II 分子陰性腫瘍細胞における Th の誘導は、腫瘍細胞上の TAA の直接認識によるものではないことを報告している。またこれらの研究結果から、Th による TAA の認識は次のように考えられている。すなわち、何らかの機序によって放出された TAA (shedding や非特異的な免疫学的攻撃などによる腫瘍細胞傷害によって起こる漏出など) を pick up した抗原提示細胞 (APC) が、抗原を processing し、APC 上の MHC class II 分子を介して提示されたこの TAA ペプチドを Th が認識することにより活性化されると考えられている。さらに最近、抗腫瘍免疫の誘導においては Th の誘導のみならず、CTL の誘導にも APC が重要であることが報告された。Huang らは、増殖能を消失させた MHC class I 分子陰性のメラノーマ細胞をマウスに免疫し、メラノーマ細胞に対する CTL の誘導について検討したところ、MHC class I 分子陽性のメラノーマ細胞を免疫したマウスと同程度の CTL が誘導されることを示している^{12,13)}。これは、腫瘍細胞特異的な CTL の誘導には、腫瘍細胞の直接認識よりも、むしろ APC の MHC class I 分子を介して提示された TAA ペプチドの認識の方が、より大きく寄与していることを示唆している。以上の事実は、腫瘍免疫を効果的に誘導する際の鍵を握る免疫担当細胞が APC であることを示しており、腫瘍ワクチンのためのアジュバント開発には TAA を APC に送達するという、いわゆる "Drug Delivery System" の技術を応用することが重要であるという結論へと導くものである。

さて、APC の 1 つであるマクロファージ (Mφ) は、陽電荷担体を積極的に取り込むという細胞生理機能を有することが知られている¹⁴⁻¹⁶⁾。しかしながら、この APC の特性を利用し、アジュバント開発に結びつけようとする研究は皆無であった。そこで本研究では、安全性の高い薬物キャリアーであるリポソームを腫瘍ワクチン用アジュバントの候補として開発する目的で、リポソームの電荷とアジュバント効果の相関を検討し、アジュバントとしての最適なリポソーム粒子設計を試みた。

実 験 の 部

1. 試 料

卵黄レシチン (PC)、フォスファチジン酸 (PA) は日本油脂のものを、コレステロール (Chol)、ステアリン酸 (SA) は和光純薬のものを、Ovalbumin (OVA) は Sigma の Grade V を、Alum は Pierce の Inject Alum を用いた。

2. 動物・細胞

C 57 BL/6 雄性マウス (6~8 週齢) は日本 SLC から購入した。EL 4 (東北大学加齢医学研究所・癌細胞保存施設より供与)、Meth A、Colon 26 は RP 1640 (10% 牛胎児血清含有 RPMI-1640) で、初代培養マウス脾細胞は 50 μM 2-mercaptoethanol を含有する RP 1640 で培養した。また OVA 発現遺伝子を導入した

101 neol 201 PRU 19
AZU OTS2A HO 2ndmulo 3101 809 2AO

EL 4 クローンである EG 7 (ATCC より購入) は 400 $\mu\text{g/ml}$ G 418 を含有する RP 1640 で培養した¹⁷⁾.

3. リポソームの作製

リポソームは, Bangham らの方法に準じて作製した. 各混合脂質 (7.5 mg) を混合有機溶媒 (塩化メチレン: ジエチルエーテル=56:44) に溶解し, ロータリーエバポレーターにて薄膜を作製後, OVA 溶液 (4 mg/ml), または Meth A 由来の腫瘍抗原溶液 (2 mg/ml) を 200 μl 加え, ボルテックスミキサーにより多重膜リポソーム (MLV) を作製した. リポソームの脂質組成についてはモル比, SA:PC:Chol=1:4:5 (陽電荷リポソーム), PA:PC:Chol=2:3:5 (陰電荷リポソーム), PC:Chol=1:1 (中性電荷リポソーム) のものを使用した. 本法で作製されたリポソームの平均粒子径は, 各リポソームとも約 1~1.5 μm であり, 各リポソーム間で大きな差は認められなかった (data not shown). また本研究において, 抗原溶液を用いて作製したリポソームについては, リポソーム内に封入されなかった抗原を除かずに実験に供したことを付記しておく.

4. マクロファージへのリポソームの取り込み

マクロファージ (M ϕ) は, C 57 BL/6 マウスのチオグリコレート誘発腹腔浸出細胞中の接着細胞分画 (90% \leq Mac-1⁺) を用いた. ³H-cholesteryl hexadecyl ether を用いてラベルしたリポソームを M ϕ とともに 37°C または 4°C で 2 時間培養し, 各温度における取り込み量を放射活性を指標に評価した.

5. *In vivo* における CTL 誘導能の評価

CTL の誘導能は, OVA をモデル抗原とし, Target 細胞には EG 7 と EL 4 を用いて評価した¹⁷⁾. 一般にウイルス抗原や突然変異によって産生された TAA などの非自己抗原・異常自己抗原 (内在性抗原) は細胞質内で発現・存在した場合, MHC class I によって抗原提示されることが知られている. CTL は, MHC class I 上に提示されている抗原を認識し, 細胞傷害活性を示すことから, 親株である EL 4 と EG 7 に対する CTL の感受性を比較検討することによって, OVA 特異的な CTL 活性を検出することが可能である (Fig. 1). C 57 BL/6 マウスの背部皮下に OVA 単独, または OVA 封入リポソーム (100 μg OVA/mouse) を単回免疫し, 10 日後に脾細胞を回収した後, mitomycin C 処理をした EG 7 と mixed lymphocyte tumor cell culture (MLTC) を行うことで CTL を 2 次抗原刺激した. 5 日後 CTL を回収し, Na₂⁵¹CrO₄ でラベルした EL 4, EG 7 に対して 4 時間の ⁵¹Cr-release assay を行った (Fig. 1).

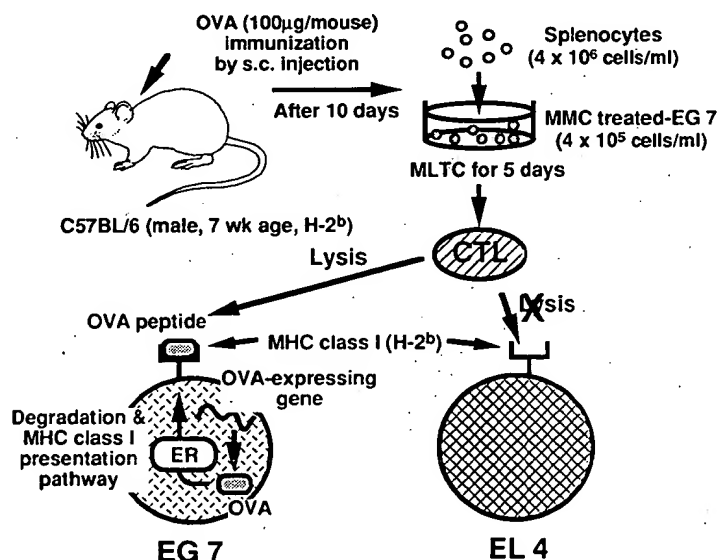


Fig. 1. Schematic Protocol of OVA-Specific CTL Assay

6. OVA 特異的抗体産生の評価

C57 BL/6 マウスの背部皮下に OVA 単独, OVA 封入リポソームまたは, ポジティブコントロールとして現在臨床応用されている唯一のアジュバントである Alum を吸着させた OVA (100 μ g OVA/mouse) を単回免疫し, 経日的に採血をした. 各マウスの血清中 OVA 特異的抗体価を ELISA 法を用いて評価した.

7. Tumor rejection assay

Meth A を用いた腫瘍モデルにおいては, 抗原として Meth A を 2.5%ブタノール/リン酸緩衝液で抽出した細胞膜抗原 (Meth A 由来 crude butanol extract, Meth A-CBE) を実験に供した. BALB/c マウスの背部皮下に Meth A-CBE 単独, または Meth A-CBE 封入リポソーム (10 または 50 μ g Meth A-CBE/mouse/time) を day-21 と day-7 の 2 回免疫し, 最終免疫から 1 週間後の day 0 に Meth A, または Colon 26 を 5×10^5 cells 腹部皮内に移植した. またカラゲニン処理は, day-21, day-14, day-7 にカラゲニンを 50 μ g/mouse/time 腹腔内に投与することにより行った. 腫瘍ワクチン効果は経日的に腫瘍径を測定し, 以下の式を用いて腫瘍の大きさを算出することにより評価した¹⁸⁾.

$$(\text{腫瘍の大きさ}) = ((\text{長径}) \times (\text{短径})^2)^{1/3}$$

結果 および 考察

1. マクロファージ (M ϕ) による取り込みに及ぼすリポソームの表面電位の影響と抗原特異的な免疫反応誘導能の評価

Table I に今回用いたリポソームの表面電荷 (ζ 電位) を示した. リポソームの脂質組成の変化に伴い, リポソーム表面の ζ 電位が任意に制御できることが確認された. そこで種々の電荷を有するリポソームを ^3H ラベル化し, M ϕ への取り込み量を検討した. その結果, 4°C における M ϕ への吸着には差が認められ

TABLE I. Lipid Composition and ζ -Potential of Surface Charge of Liposomes

Surface charge of liposome	Lipid component (molar ratio)	ζ -Potential (mV)
Positively charged	SA:PC:Chol (1:4:5)	8.85
Negatively charged	PA:PC:Chol (1:4:5)	-18.6
Neutrally charged	PC:Chol (1:1)	-5.04

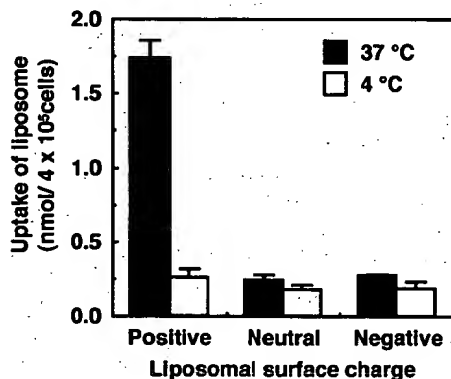


Fig. 2. Effects of Surface Charge on the Uptake of ^3H -Labeled MLVs by Murine Peritoneal Macrophages

Macrophages were incubated with variously charged MLVs containing ^3H -cholesteryl hexadecyl ether for 2 h at 37°C (■) and 4°C (□). Results are expressed as mean \pm S. E. for 3 experiments/group.

なかったが、37°Cにおける細胞内への取り込みについては、陰電荷リボソーム、中性電荷リボソームと比較して、陽電荷リボソームにおいて有意な取り込み上昇が認められた (Fig. 2)。本結果は、リボソームにおいても表面電荷を陽電荷とすることにより、リボソームがMφに積極的に細胞内へ取り込まれることを示唆している。従って、リボソームをカチオン化することにより、リボソームに封入した抗原をMφに積極的に取り込ませ得る可能性が示されたとともに、陽電荷リボソームをアジュバントとして用いることで、効率よく抗原特異的な免疫反応を誘導できるものと考えられた。

一方、腫瘍免疫における抗原特異的な腫瘍細胞破壊機構は、1) CTLにより媒介される機構、2) 抗腫瘍抗体と補体により細胞破壊に至る機構、3) 抗体がMφやnatural killer cellのようなFcレセプターを有する細胞とともに細胞破壊を起こす機構が挙げられる。従って、TAAを用いた腫瘍ワクチン療法において抗原特異的なCTLの誘導や抗体産生が、効果的な抗腫瘍免疫を獲得させるための必須条件となってくる。そこで次に各リボソームのアジュバントとしての有効性を評価するために、モデル抗原を用いて抗原特異的なCTL誘導能と抗体産生能について検討した。

OVA単独、または各リボソームを用いてOVA (100 µg OVA/mouse)を免疫したC57BL/6の脾細胞を回収し、EG7を用いて*in vitro*で2次抗原刺激をしたリンパ球について、EL4、EG7をtarget cellとした⁵¹Cr-release assayを行った (Fig. 1)。その結果Fig. 3に示すように、OVA単独投与群や陰電荷リボ

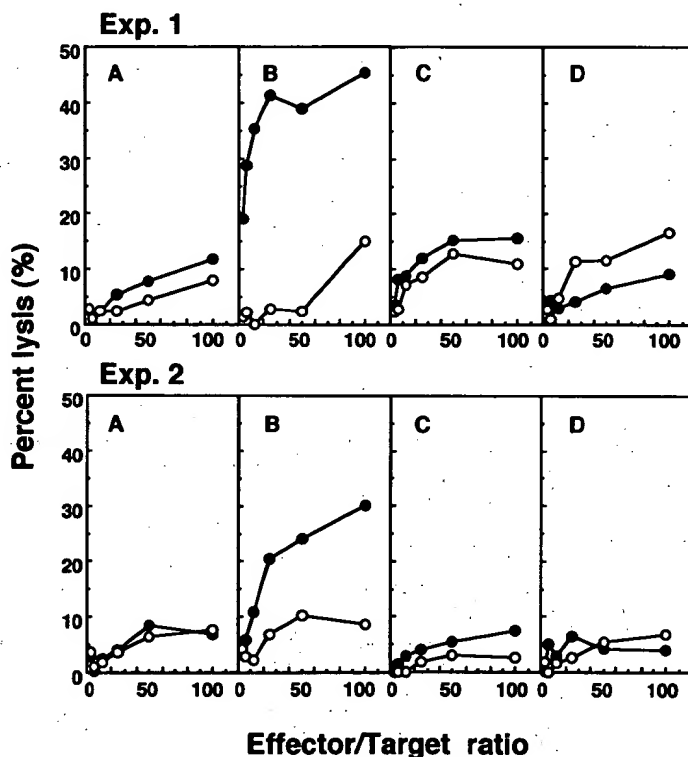


Fig. 3. OVA-Specific CTL Response after *in vivo* Priming with OVA-Containing MLVs of Various Surface Charges or OVA Alone

Spleen cells from C57BL/6 mice that had been immunized with OVA alone (A), OVA in positively charged (B), negatively charged (C) and neutral (D) MLVs were assayed for cytotoxic activity after *in vitro* stimulation with EG7 for 5 days. The figures represent the amount of lysis obtained from two independent experiments with ⁵¹Cr-labeled targets: (●) EG7 and (○) EL4.

ソームまたは中性電荷リポソームをアジュバントとして免疫した群においては、CTLの誘導が全く認められなかったが、陽電荷リポソームを用いた群においては明らかなCTLの誘導が観察された。また免疫動物としてBALB/cマウス、モデル抗原として β -galactosidaseを用いた場合においても同様の結果が得られた (data not shown)。

次にC57BL/6にOVAを100 μ g投与した際の、OVA特異的血中抗体価についても検討を加えた。その結果、抗体産生においてもOVA単独投与群や陰電荷リポソーム、中性電荷リポソームをアジュバントとして免疫した群と比較して、陽電荷リポソームを用いた群では明らかにその産生が有意に上昇しており、positive controlであるAlumを用いた群と同等の抗体産生誘導が確認された (Fig. 4)。従って、リポソームをカチオン化することにより、*in vivo*においても抗原をM ϕ により効率よく送達できた結果、効果的な抗原特異的免疫反応が誘導されたものと考えられる。

しかし一方で我々の結果とは逆に、Hsuらは*in vitro*において陽電荷リポソームよりも陰電荷リポソームの方が効率よく取り込まれるということを報告している¹⁹⁾。陰電荷リポソームは、M ϕ のスカベンジャーレセプターを介して取り込まれたものと推察されている²⁰⁾が、本実験では、*in vitro*において陰電荷リポソームよりも陽電荷リポソームの方が、より積極的に取り込まれるという結果を得た。またそれを反映して、*in vivo*におけるアジュバント効果においても陰電荷リポソームと比較して、陽電荷リポソームの方がより効果的であった。さらに我々は、陽電荷リポソームの陽電荷密度を上昇させることにより、CTL誘導能および抗体産生誘導能が上昇する¹⁹⁾が、陰電荷リポソームの陰電荷密度を上昇させても抗体産生誘導能に変化が認められないことを確認している (data not shown)。この事実は、*in vivo*においても陽電荷密度を上昇させることにより、リポソームとマクロファージとの親和性や抗原送達能が向上し、効果的なアジュバント効果が得られたことを示唆する一方で、陰電荷密度を上昇させてもマクロファージとの親和性や、抗原送達能に変化がない可能性を示唆している。また、PAやフォスファチジルセリンなどの陰電荷脂質は、種々の免疫担当細胞に対して抑制的に働くことも報告されており、*in vivo*においてたとえマクロファージが陰電荷リポソームを効率よく取り込んだとしても、陰電荷脂質の持つこのような機能が、それ以降の種々の免疫反応を阻害したのかもしれない²¹⁻²³⁾。

2. 陽電荷リポソームの腫瘍ワクチン用アジュバントとしての効果

これまでの結果から、陽電荷リポソームを用いることにより、抗原特異的な免疫反応が顕著に増強される

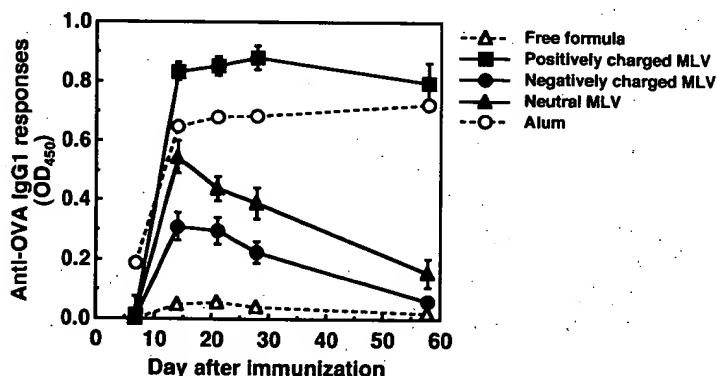


Fig. 4. Priming of OVA-Specific Serum IgG1 Responses by Immunizing with Various Formulated OVA

C57BL/6 mice were immunized with positively charged (■), negatively charged (●) and neutral (▲) liposomal OVA, OVA in alum (○) or OVA alone (△) and serum samples were collected from the tail vein at different time intervals after the primary immunization. Anti-OVA IgG1 in sera, diluted 1:200, was determined by ELISA. Results are expressed as mean \pm S. E. for 4 mice/group.

ことが明らかとなった。そこで次に、実際に各電荷を有するリポソームを腫瘍ワクチンに用いた際のアジュバント効果について検討を加えた。腫瘍関連抗原 (TAA) としては、Meth A を 2.5% ブタノール/リン酸緩衝液で抽出した細胞膜分画 (Meth A crude butanol extract, Meth A-CBE) を実験に供した。BALB/c マウスの背部皮下に Meth A-CBE 単独、または Meth A-CBE 封入リポソームを 2 週間間隔で 2 回免疫後、1 週間後に Meth A を移植し、経日的に腫瘍径を測定することで腫瘍ワクチン効果を評価した。その結果、Fig. 5 に示すように、陰電荷リポソーム、中性電荷リポソームをアジュバントとして免疫した群においては、抗原単独投与群と比較して何ら有為な変化は認められなかったが、陽電荷リポソームを用いた群においては明らかな腫瘍ワクチン効果が認められた。また、Meth A 移植 30 日後の腫瘍拒絶率についても検討をしたところ、抗原単独投与群や陰電荷リポソーム、中性電荷リポソームをアジュバントとして免疫した群においてはわずか 12.5~16.7% の腫瘍拒絶例しか認められなかったものの、陽電荷リポソームを用いた群においては 66.7% と高い治癒率を示した (Table II)。さらに Meth A の代わりに Colon 26 を移植した場合には、全く効果が認められなかったことから、Meth A に対する抗腫瘍効果は抗原特異的な効果であることが確認された (Fig. 6)。この効果は、OVA をモデル TAA とし、EG 7 を腫瘍モデルとした実験においても

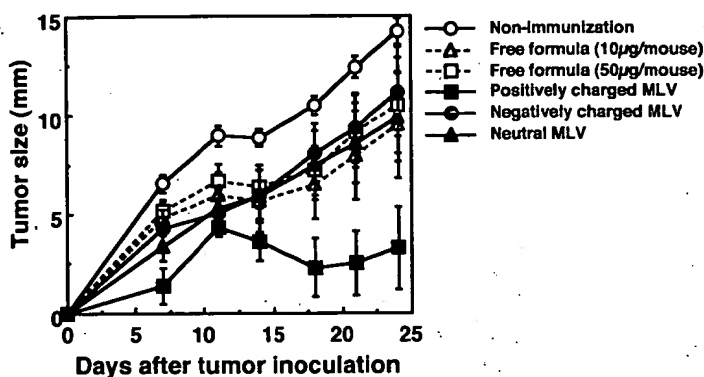


Fig. 5. *in vivo* Vaccinal Effects of Various Charged MLVs Containing Meth A-CBE against Meth A Tumor Growth

BALB/c mice were not immunized (○) or immunized subcutaneously twice with 10 µg of Meth A-CBE alone (△), positively charged (■), negatively charged (●) neutral (▲) liposomal Meth A-CBE or 50 µg of Meth A-CBE alone (□) with an interval of 2 weeks between treatments. Seven days after the last immunization, they were challenged intradermally in the abdomen with 5×10^5 Meth A cells. Tumor growth was monitored at the indicated time points after tumor inoculation. Results are expressed as mean \pm S. E. for 5-8 mice/group.

TABLE II. Anti-Tumor Vaccinal Effect of Liposomal Meth A-CBE

Treatment	Dose (µg/mouse/time)	Tumor regression ^{a)} (% total)
Non-treatment	—	0
Free	10	16.7
	50	14.3
Negatively charged MLV	10	12.5
Neutral MLV	10	16.7
Positively charged MLV	10	66.7
Positively charged MLV+carrageenan	10	25.0

a) Tumor regression was defined as no tumor formation at day 30.

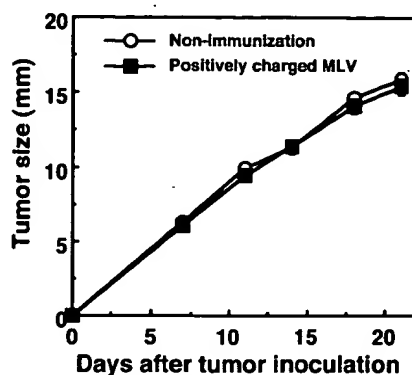


Fig. 6. *in vivo* Vaccinal Effect of Positively Charged MLV Containing Meth A-CBE against Colon 26 Tumor Growth

BALB/c mice were not immunized (○) or immunized with positively charged liposomal Meth A-CBE (■) described in Fig. 5. Seven days after the last immunization, they were challenged intradermally in the abdomen with 5×10^5 Colon 26 cells. Tumor growth was monitored at the indicated time points after tumor inoculation. Results are expressed as mean \pm S. E. for 6 mice/group.

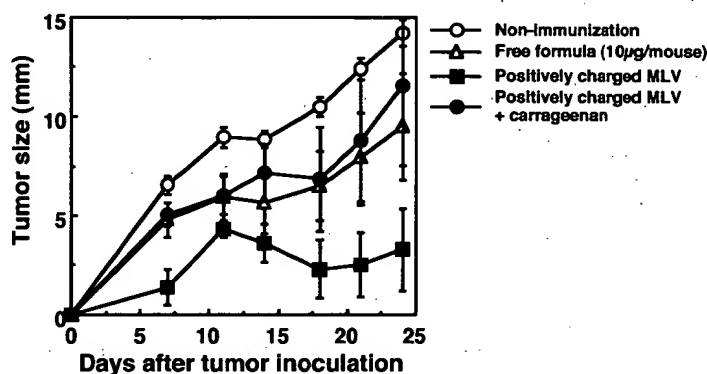


Fig. 7. Effect of Carrageenan on *in vivo* Meth A Tumor Protection with Positively Charged MLV Containing Meth A-CBE

BALB/c mice were not immunized (○) or immunized subcutaneously with Meth A-CBE alone (△) or positively charged liposomal Meth A-CBE (■) described in Fig. 5. The mice (●) immunized with positively charged liposomal Meth A-CBE were treated intraperitoneally with 1 mg of carrageenan on days 0, 4 and 14 after the first immunization. Seven days after the last immunization, they were challenged intradermally in the abdomen with 5×10^5 Meth A cells. Tumor growth was monitored at the indicated time points after tumor inoculation. Results are expressed as mean \pm S. E. for 4-6 mice/group.

確認されている (中西ら, 投稿準備中)。

次に, この実験系における陽電荷リポソームのアジュバント効果においても, $M\phi$ が関与しているかについて検討を加えた。実験は, カラゲニン BALB/c マウスの腹腔内に投与し, 腹腔に $M\phi$ を集積させ, 免疫部位 (背部皮下) において $M\phi$ が枯渇した状態で抗原感作を行った。従って, もし陽電荷リポソームが Fig. 2 の結果を反映して, 抗原を $M\phi$ に積極的に送達することで, 腫瘍ワクチン効果を発揮しているのだ

れば、カラゲニン処理をすることにより腫瘍ワクチン効果の減弱が観察されるはずである。その結果、カラゲニン処理を行ったマウスにおいては腫瘍ワクチン効果の減弱が観察され (Fig. 7), 移植後 30 日目における腫瘍拒絶率についてもカラゲニン処理をすることにより 66.7% から 25% へと減少した (Table II)。

以上の結果は、Mφ に積極的に送達するというアジュバント設計が、どのような腫瘍においても適用可能である可能性を示唆しており、今後、陽電荷リポソームの腫瘍ワクチン用アジュバントとしての応用が期待される。

結 語

リポソーム表面電荷は、アジュバント効果増強のための重要な factor の 1 つであることが確認された。リポソーム表面電荷を変化させるだけで、APC への抗原送達が可能となる最大の利点は、その簡便性にある。すなわちリポソーム作成の際に、陽電荷脂質を用いるだけでよいという決定的な利点を有している。さらに本結果はリポソームのみならず、アジュバントの候補となっている粒子状キャリアー、例えば、ラテックスビーズやマイクロスフェアなどにおいても応用可能であるものと期待される。

以上、本研究は腫瘍のみならず、様々なワクチン用アジュバント開発に有益な情報となるものと考えられる。

謝 辞 本研究の一部は、文部省科学研究費やヒューマンサイエンス振興財団、医薬品副作用被害救済、研究振興調査機構などの助成金により行われました。

また、EL 4 lymphoma を御供与頂きました東北大学加齢医学研究所・癌細胞保存施設ならびに、 ζ 電位の測定に御協力を賜りました田辺製薬株式会社に深謝します。

引 用 文 献

- 1) P. van der Bruggen, C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, T. Boon, A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma, *Science*, **254**, 1643-1647 (1991).
- 2) Y. Kawakami, S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, L. Rivoltini, S. L. Topalian, T. Miki, S. A. Rosenberg, Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 3515-3519 (1994).
- 3) A. L. Cox, J. Skipper, Y. Chen, R. A. Henderson, T. L. Darrow, J. Shabanowitz, V. H. Engelhard, D. F. Hunt, C. L. Slingluff Jr., Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines, *Science*, **264**, 716-719 (1994).
- 4) V. Brichard, A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethe, P. Coulie, T. Boon, The tyrosinase genes codes for antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas, *J. Exp. Med.*, **178**, 489-495 (1993).
- 5) R. F. Wang, P. F. Robbins, Y. Kawakami, X. Q. Kang, S. A. Rosenberg, Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes, *J. Exp. Med.*, **181**, 799-804 (1995).
- 6) T. Wolfel, M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde, D. Beach, A p16^{INK4a}-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma, *Science*, **269**, 1281-1284 (1995).
- 7) P. G. Coulie, F. Lehmann, B. Lethe, J. Herman, C. Lurquin, M. Andrawiss, T. Boon, A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 7976-7980 (1995).
- 8) A. Kosugi, T. Yoshioka, T. Suda, H. Sano, Y. Takahama, H. Fujiwara, T. Hamaoka, The activation of L3T4⁺ helper T cells assisting the generation of anti-tumor Lyt-2⁺ cytotoxic T lymphocytes: requirement of Ia-positive antigen-presenting cells for processing and presentation of tumor antigens, *J. Leukoc. Biol.*, **42**, 632-641 (1987).

- 9) H. Fujiwara, Y. Takai, K. Sakamoto, T. Hamaoka, The mechanism of tumor growth inhibition by tumor-specific Lyt-1*2⁻ T cells. I. Antitumor effect of Lyt-1*2⁻ T cells depends on the existence of adherent cells, *J. Immunol.*, **135**, 2187-2191 (1985).
- 10) K. Sakamoto, H. Fujiwara, H. Nakajima, T. Yoshioka, Y. Takai, T. Hamaoka, Requirements of adherent cells for activating Lyt-1*2⁻ T cells as well as for functioning as antitumor effectors activated by factor(s) from Lyt-1*2⁻ T cells, *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 1142-1152 (1986).
- 11) D. E. Kern, J. P. Karnet, M. C. Jensen, P. D. Greenberg, Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngenic tumor-specific class I-restricted CTL, *J. Immunol.*, **136**, 4303-4310 (1986).
- 12) A. Y. Huang, P. Golumbek, M. Ahmadzadeh, E. Jaffee, D. Pardoll, H. Levitsky, Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens, *Science*, **264**, 961-965 (1994).
- 13) A. Y. Huang, A. T. Bruce, D. M. Pardoll, H. I. Levitsky, Does B7-1 expression confer antigen-presenting cell capacity to tumors *in vivo*?, *J. Exp. Med.*, **183**, 769-776 (1996).
- 14) R. A. Schwendener, P. A. Lagocki, Y. E. Rahman, The effects of charge and size on the interaction of unilamellar liposomes with macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 93-101 (1984).
- 15) S. E. Mutsaers, J. M. Papadimitriou, Surface charge of macrophages and their interaction with charged particles, *J. Leukoc. Biol.*, **44**, 17-26 (1988).
- 16) Y. Aramaki, K. Akiyama, T. Hara, S. Tsuchiya, Recognition of charged liposomes by rat peritoneal and splenic macrophages: effects of fibronectin on the uptake of charged liposomes, *Eur. J. Pharmaceut. Sci.*, **3**, 63-70 (1995).
- 17) M. W. Moore, F. R. Carbone, M. J. Bevan, Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation, *Cell*, **54**, 777-785 (1988).
- 18) 中西 剛, 國澤 純, 林 哲, 堤 康央, 早川 堯夫, 真弓 忠範, リポソームの陽電荷密度上昇による腫瘍マクロファージ用アジュバント効果増強, *Drug Delivery System*, in press.
- 19) M. J. Hsu, R. L. Juliano, Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system. II. Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages, *Biochim. Biophys. Acta*, **720**, 411-419 (1982).
- 20) K. Nishikawa, H. Arai, K. Inoue, Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages, *J. Biol. Chem.*, **265**, 5226-5231 (1990).
- 21) G. Monastra, A. Bruni, Decreased serum level of tumor necrosis factor in animals treated with lipopolysaccharide and liposomes containing phosphatidylserine, *Lymphokine Cytokine Res.*, **11**, 39-43 (1992).
- 22) T. Daemen, J. Regts, G. L. Scherphof, Liposomal phosphatidylserine inhibits tumor cytotoxicity of liver macrophages induced by muramyl dipeptide and lipopolysaccharide, *Biochim. Biophys. Acta*, **1285**, 219-228 (1996).
- 23) D. J. Carr, V. Guarcello, J. E. Blalock, Phosphatidylserine suppresses antigen-specific IgM production by mice orally administered sheep red blood cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **200**, 548-554 (1992).